Prijenos unutarstaničnih signala preko mTORC1

Habulin, Dunja

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:409036

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

PRIJENOS UNUTARSTANIČNIH SIGNALA PREKO mTORC1

TRANSMISSION OF INTRACELULAR SIGNALS MEDIATED BY mTORC1

SEMINARSKI RAD

Dunja Habulin

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: dr. sc. Ita Gruić

Zagreb, 2014.

SADRŽAJ

1. UVOD – opća obilježja TOR kompleksa 1
2. mTOR – struktura i organizacija 2
   2.1. Struktura i inhibitori mTORC1 3
   2.2. Struktura i općenita uloga mTORC2 3
3. mTORC1 – interakcije u stanici 4
   3.1. Osjećanje aminokiselina na lizosomu 4
      3.1.1. TSC – RHEB inhibicija 5
      3.1.2. Rag GTP-aze 5
      3.1.3. Ragulator kompleks 6
      3.1.4. Vakuolarna H^+-ATP-aza 7
   3.2. MAP4K3 i S6K kao aktivatori mTORC1 kompleksa 8
   3.3. PI3K/Akt/mTORC1 signalni put 9
4. Interakcije mTORC1 i leucil-tRNA-sintetaze 9
   4.1. Leucil-tRNA-sintetaza 9
   4.2. Istraživanje interakcija leucil-tRNA-sintetaze mTORC1 – S6K 11
   4.3. Lizosomalna lokalizacija i utjecaj na veličinu stanice 13
   4.4. LRS u direktnoj interakciji s RagD GTP-azom 13
      4.4.1. Peptidni slijedovi RagD GTP-aze i LRS koji stupaju u međusobnu interakciju 13
      4.4.2. Utjecaji inaktivacija aktivnosti LRS i Rag, LRS i lizosomalna lokalizacija 14
      4.4.3. Molekularni kompleks LRS, RagD i Raptora ovisan o aminokiselinama 14
   4.5. LRS kao senzor leucina u stanici 15
      4.5.1. Neovisnost leucilacije o interakciji LRS i RagD 15
      4.5.2. Leucil-tRNA-sintetaza je protein koji aktivira GTP-aznu aktivnost (GAP) 16
5. Inhibitori mTORC1 kompleksa 17
   5.1. Rapamicin 17
   5.2. Ursolična kiselina 18
6. Autofagija 19
7. Sažetak 20
8. Summary 22
9. Literatura 22

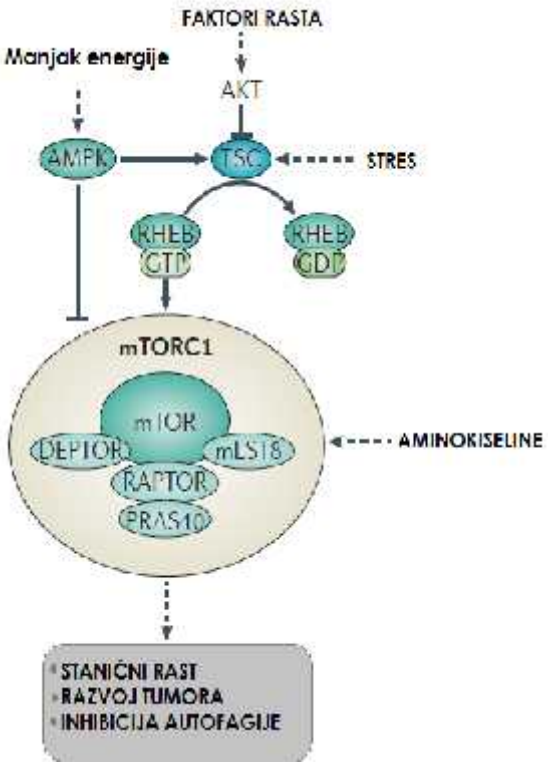
1. UVOD – opća obilježja TOR kompleksa [1, 2, 3]

Eukariotske stanice ovise o dostupnosti nutrijenata kako bi održale rast. Organizmu trebaju aminokiseline kao izvor energije, gradivni elementi za sintezu proteina i kao signalne molekule. Jedan od signalnih puteva na koje utječu aminokiseline je i put koji aktivira protein serin/treonin kinazu metu rapamicina (engl. *target of rapamycin*), skraćeno TOR ili mTOR. TOR je otkriven otkrićem antibiotika rapamicina kojeg proizvodi bakterija *Streptomyces hygroscopicus*. Rapamicin je pronađen kao metabolički produkt ove bakterije s izuzetnim fungicidnim djelovanjem, a kasnije je otkriveno da rapamicin ima i inhibitorno djelovanje na proliferaciju stanica u viših eukariota. Ta su otkrića potakla znanstvenike na istraživanje o detaljnijem učinku rapamicina na organizam. U zadnjih nekoliko desetljeća, istraživanja su dokazala važne uloge TOR kompleksa, pa ne čudi da je mTOR visoko očuvan od kvasaca do ljudi.

Ideja da aminokiseline imaju utjecaj na signalizaciju putem kompleksa TOR dolazi iz istraživanja na kvascu *Saharomyces cerevisiae.* Razina translacije kvaščeve mRNA se prilično smanjila kada je stanica bila u okruženju s rapamicinom ili kada su mutirani geni TOR, što je bilo praćeno kataboličkim procesima kao što je autofagija. Također, u istraživanjima na organizmu *Drosophila melanogaster*, dokazano je da prilikom osjetnog smanjenja aminokiselinama dolazi do smanjenja veličine stanica i do endoreplikacije, slično kao i prilikom mutacije u genima TOR. Očito je da aminokiseline imaju pozitivnu ulogu u kontekstu regulacije TOR signalizacije.

TOR kompleks se dijeli na dva kompleksa – mTORC1 i mTORC2. Ti kompleksi dijele katalitičku jedinicu – mTOR, a razlikuju se u ostalim podjednicama (Slika 2.). U ovom će se radu najveća pažnja posvetiti leucinu kao signalnoj molekuli – aminokiselini koja omogućava kompleksu mTORC1 osjećanje razine aminokiselina u stanici. Naime, sam mTORC1 ima brojne funkcije u stanici: regulira sintezu proteina, biogenezu ribosoma, anabolizam proteina u mišićima, unos nutrijenata i autofagiju, anablizam aminokiselina te energetski status stanice, a sudjeluje i u odgovoru na unutarstanični stres. Unutarstanični stres podrazumijeva bilo kakvu promjenu uvjeta koji odudaraju od normalnog stanja, pa će u to ulaziti i viša ili niža koncentracija aminokiselina u stanici, a mi ćemo se ovdje pobliže dotaknuti baš takvog unutarstaničnog stresa izazvanog promjenom količine aminkiselina.

Svaki regulatorni enzimski kompleks ima nešto što će ga inhibirati i aktivirati, pa tako ima i TOR. Inhibicije i aktivacije ovise o unutarstaničnim uvjetima i služe boljoj regulaciji, ali također postoje i vanstanični inhibitori koji će usmjeriti stanicu u autofagiju, bez obzira na to što ne postoji dodatna potreba stanice za biološkim materijalom.



Slika 1. Skraćeni prikaz mTOR1 signalnog puta i strukture mTORC1. Preuzeto iz [4].

2. mTOR – struktura i organizacija [1, 2]

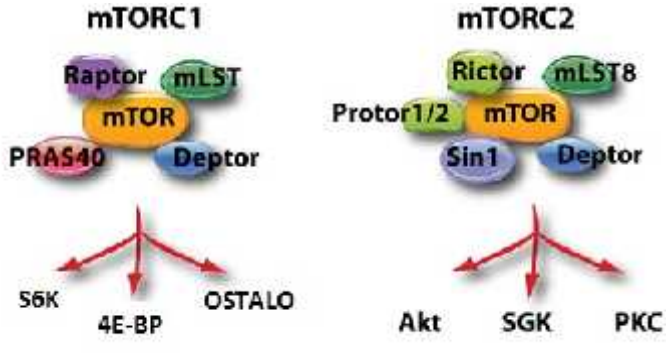
Protein mTOR je 289 kilodaltonska serin/treoninska kinaza koja pripada fosfatidilinozitol-3 kinaznoj obitelji i evolucijski je očuvan. Signalni put tog proteina integrira unutarstanične i izvanstaničene signale i središnji je regulator staničnog metabolizma, rasta, proliferacije i preživljavanja. Brojni procesi ga aktiviraju (angiogeneza, tumori, otpornost na inzulin...), a poremećaji u regulaciji se očituju pri razvoju bolesti poput raka ili dijabetesa tipa 2. Korištenjem poznatih inhibitora ovog proteina (rapamicin i njegovi analozi), moguće je pomoći pri liječenju tumora, pri organskim transplatacijama te reumatoidnom artritisu. Kao što je rečeno u uvodu, on tvori dva kompleksa – mTORC1 i mTORC2.

2.1. Struktura i inhibitori mTORC1 [3]

Kompleks mTORC1 se sastoji od 5 podjedinica: mTOR – katalitička jezgra, mLST8 - ortolog sisavaca za kvaščev protein (engl. *mammalian lethal with SEC 13 protein 8*), Deptor - mTOR interreagirajući protein koji sadrži DEP domenu (engl. *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*), Raptor - regulatorni pridruženi protein kompleksa mTOR (engl. *regulatory associated protein of mTOR*) i PRAS40 - prolin bogati Akt 40 kilodaltonski supstrat (engl. *proline-rich AKT substrate 40kDa*). TSC (1 i 2 kompleks, engl. *tuberous sclerosis complex)* je protein koji aktivira intrističnu GTP-aznu funkciju određenih proteina (engl. *GTPase activating protein – GAP*). TSC je jedan od inhibitora mTORC1, zaustavlja prijenos signala vezanih uz faktore rasta i unutarstanične energetske signale. Uz spomenuti TSC, od inhibitora ću još pisati o već spomenutom rapamicinu i ursoličnoj kiselini.

2.2. Struktura i općenita uloga mTORC2 [2]

Kompleks mTORC2 se sastoji od šest različitih proteina, neki su zajednički mTORC1: mTOR, Rictor - rapamicin neosjetljiv pratioc mTOR-a (engl. *rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSIN1 - stres aktivirani protein kinazni interreagirajući protein sisavaca (engl. *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein*), Protor-1 - protein koji prati Rictor 1 (engl. *protein obsered with Rictor-1*), mLST8 i Deptor. mLST8 je esencijalan za mTORC2 funcikcionalnost, dokazano je da inaktivacija aktivnosti ovog proteina (engl. *knock out*) prilično smanjuje stabilnost i aktivnost mTORC2. mLST8 omogućava interakciju između proteina Rictor i kompleksa mTORC2. Ukoliko nema mLST8, narušena je dotična interakcija i funkcija mTORC2. Još se uvijek ne zna puno o mTORC2, i to iz dva razloga. Prvi je taj da je nedostatak mTORC2 letalan, a drugi je to što ne postoje poznati inhibitori koji bi možda pomogli otkriti ulogu mTORC2. No, pretpostavlja se da mTORC2 nema uloga u senzora koncentracije aminokiselina u stanici.

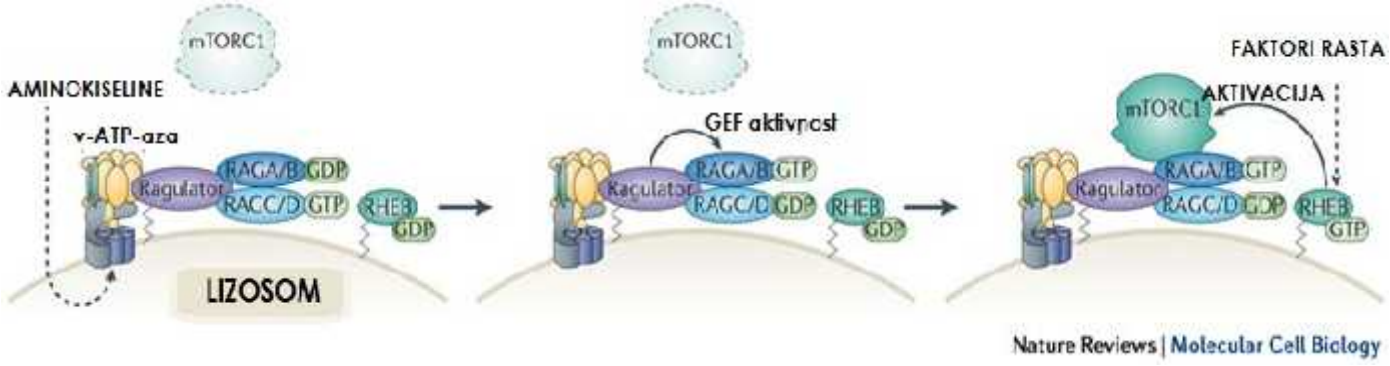


Slika 2. Shematski prikaz podjedinica i posljedica aktivacije mTORC1 (lijevo) i podjednice i posljedica aktivacije mTORC2 (desno). Preuzeto iz [5].

3. mTORC1 – interakcije u stanici [2, 3]

Obzirom na važnu ulogu ovog kompleksa u stanici, logično je da stupa u interakcije s brojnim drugim proteinima i proteinskim kompleksima kako bi mogao ispuniti svoje zadaće. Regulirajući translaciju i stanični rast, mTORC1 mora koordinirati te procese s uzvodnim unosima poput faktora rasta, unutarstaničnog statusa energije i dostupnošću aminokiselina. Primjerice, kad je razina aminokiselina u stanici niska, translacija će biti inhibirana upravo preko signalnih putema koji koriste kompleks mTORC1, a u kritičnim slučajevima, aktivirat će se signalni putevi koji će usmjeravati stanicu u autofagiju. Uz interakciju mTORC1 kompleksa s proteinima i proteinskim kompleksima, on je i u indirektnoj interakciji s aminokiselinama, i to posebno s leucinom. Veza između leucina i mTORC1 kompleksa je zanimljiva i bit će posebno obrađena u ovome radu.

3.1. Osjećanje aminokiselina na lizosomu



Slika 3. Slijed događaja na površini lizosoma nakon indukcije aminokiselinama. Preuzeto iz [4].

3.1.1. TSC – RHEB inhibicija [3]

RHEB je homolog proteina RAS[1] koji se preferentno nalazi u mozgu, a nalazi se na površini lizosoma, usidren u membranu. GTP vezni oblik proteina Rheb aktivira mTORC1 kompleks jer se smatra da pomaže u prepoznavanju supstrata mTORC1 kompleksa, npr. 4E-BP1 i S6K1 o kojima će detaljnije biti rečeno kasnije. Inhibicija mTORC1 kompleksa odvija se i preko proteina Rheb jer TSC utječe na hidrolizu GTP↔GDP na Rheb-u, tj. omogućava hidrolizu vezanog GTP-a čime se onemogućuje prijenos signala između proteina Rheb i kompleksa mTORC1.

Stimulansi poput inzulina ili faktora rasta, uzrokovat će pokretanje određenih signalnih kaskada koje će rezultirati fosforilacijom TSC2 i disocijacijom TSC1/2 kompleksa. Disocijacija ovog kompleksa omogućava veću količinu GTP veznog oblika proteina Rheb, a time se, kao što je već rečeno, aktivira kompleks mTORC1.

3.1.2. Rag GTP-aze [3]

Smatra se da je važno obilježje mTORC1 signalnog puta njegova translokacija na lizosomalnu ili kasno endosomalnu membranu, a Rag GTP-aze u tom procesu imaju važnu ulogu. Rag proteini pripadaju u super obitelj RAS proteina, no imaju malo drugačija obilježja: dugu karbonilnu terminalnu domenu, nedostaje im slijed koji omogućava usidravanje na membranu i imaju svojstvo da tvori heterodimere.

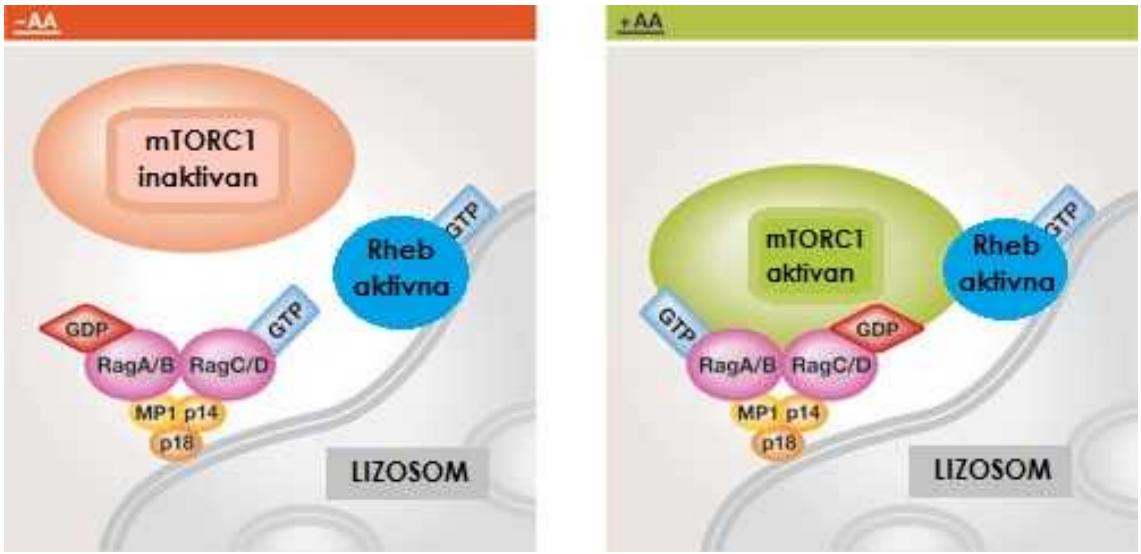
U sisavaca postoje četiri Rag proteina: RagA i RagB (Gtrl u kvasaca), visokog stupnja sličnosti u slijedu aminokiselina, te RagC i RagD (Gtrl2 u kvasaca), također visoke sličnosti u slijedu aminokiselina, ali funkcionalno isti. Nastaju dimeri između RagA i RagC ili D, te RagB i RagC ili D. Dimerizacija Rag GTP-aza je važna za aktivaciju mTORC1 kompleksa i stabilnosti Rag proteina. Naime, svojstvo dimera Rag proteina da veže GTP i GDP ovisi o prisustvu aminokiselina, mijenja se i njihovo GTP↔GDP stanje. Primjerice, kada je stanica bogata aminokiselinama, u RagA-RagC kompleksu, aminokiseline će poticati vezanje GTP-a na RagA, a GDP-a na RagC. Dakle, RagA/RagB•GTP-RagC/RacD•GDP ukazuju na aktivirani kompleks (suprotna stanja ukazuju na inaktivirani kompleks). Isto tako, u kvasaca, Gtrl•GTP-Gtrl2•GDP označava aktivirani kompleks. Jednom kada nastane aktivirani Rag dimer, on će se direktno vezati za mTORC1, i to za podjedinicu Raptor, čime će se potaknuti relokalizacija mTORC1 na membranu organela u kojima se nalazi Rheb. Na membrani će mTORC1 stupiti u interakciju s Ragulator kompleksom, o kojem će riječ biti u sljedećem

[1] RAS proteini - velika super obitelj proteina, G proteini niske molekularne mase.

odlomku. Nakon interakcije, Ragulator će privlačiti Rag GTP-aze na lizosomalnu membranu i primaknuti mTORC1 bliže njegovome aktivatoru – Rheb-GTP-u, kako bi se omogućio prijenos signala. Ne zna se točno kako su Rag i Rheb proteini usmjereni na membranu lizosoma i važnost tog usmjerenja obzirom na signalizaciju nutrijenata putem kompleksa mTORC1, no pretpostavlja se da je Rheb usmjeren na membranu pomoću svojeg C terminalnog motiva[2].

Ovaj model predlaže mehanizam pomoću kojeg mTORC1 odgovara na mnogostruke podražaje na lizosomu – aminokiseline preko Rag GTP-aza i faktore rasta preko Rheb-a. Zanimljivo je to da je mTORC1 raspršen u stanici tijekom nedostatka aminokiselina, dok je redistribuiran na membranu lizosoma u slučajevima stimulacije aminokiselinama.

Rag heterodimer ključan je za mTORC1 aktivaciju, točnije – njegovo guanin nukleotidno stanje. Naime, u uvjetima gladovanja, prekomjerna ekspresija RagA/B●GTP je dovoljna za aktivaciju mTORC1, što indicira na veću važnost RagA/B u regulaciji mTORC1 kompleksa.



Slika 4. Prikaz Rag heterodimera i njihove interakcije s mTORC1. Preuzeto iz [6].

3.1.3. Ragulator kompleks [1, 3, 7]

Ragulator kompleks sastoji se od pet podjedinica: p18, p14, MP1, C7orf59 i HBXIP. Dokazano je da je on taj koji usidruje Rag proteine na membranu lizosoma, i to preko podjedinice p18 (slika 4.). Naime, izostanak Ragulatora dokida Rag GTP-aznu i mTORC1

[2] CAAX motiv – C - Cys, A - alipatski bočni ogranak, a X je terminalna aminokiselina.

translokaciju na membranu lizosoma, što ukazuje na veliku važnost Ragulatora u pozicioniranju kompleksa mTORC1.

Nedavno je dokazano da je Ragulator važan u ulozi promotora izmjene GDP-a za GTP u RagA/B, čime se aktivira Rag kompleks. Dakle, Ragulator spada u skupinu proteina koji stimuliraju GDP/GTP izmjenu G proteina (GEF, engl. *guanine exchange factor*). Ragulator nema GEF funkciju u slučaju Rag C/D.

3.1.4. Vakuolarna H^+-ATP-aza [1, 8]

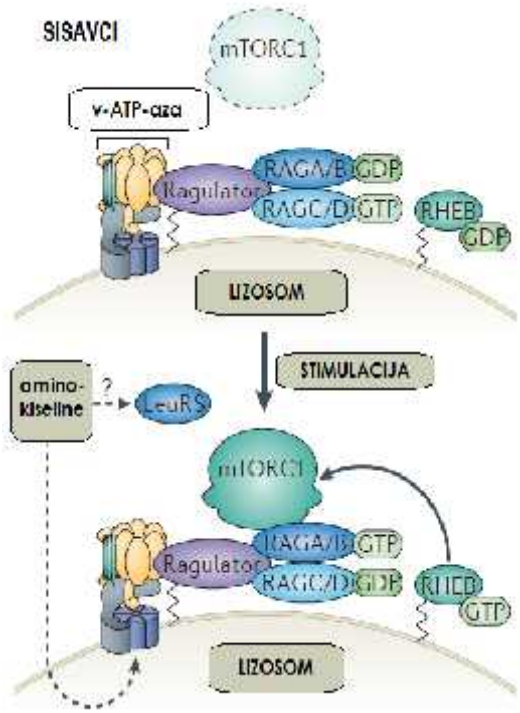
Bazirano na dosadašnjim istraživanjima, lizosom se pokazao kao vrlo važan organel po pitanju lokalizacije i aktivacije Ragulatora, Rag GTP-aza i samog mTORC1. Istraživači su simulirali sustav bez stanice koji je sadržavao pročišćeni mTORC1 i izolirane Rag GTP-aze vezane za lizosom, dodali su sustavu aminokiseline i to je bilo dovoljno za Rag GTP-aznu interakciju s mTORC1. Time se indiciralo da lizosom ima sve što je potrebno za aktivaciju mTORC1 potaknutu aminokiselinama.

Vakuolarna ATP-aza ima dvije domene: perifernu (citosolnu) V1domenu, koja se sastoji od 8 podjedinica i integralnu (membransku) V0 domenu, koja se sastoji od 5 podjedinica. V1 domena hidrolizira ATP kako bi osigurala energiju za translokacije H^+ kroz kanal V0 domene što uzrokuje acidifikaciju lumena lizosoma. Upravo V1 stupa u interakciju s Rag GTP-azama, a obje stupaju u interakciju s Ragulatorom. Rag GTP-aze i Ragulator regulirani su koncentracijom aminokiselina, interakcije su jače prilikom veće koncentracije aminokiselina zato što je krajnji efekt stimulacije mTORC1 poboljšana translacija. A ako stanica ima viška aminokiselina, znači da ih treba iskoristiti kao gradivne blokove proteina, odnosno, takav signal stanica tumači na način „Stanje je obilja energije – spremi ju.“. Kad stanici nedostaje nutrijenata, nema stimulansa mTORC1 kompleksa jer cilj stanice nije stvarati nove gradivne elemente, nego razgraditi postojeće i preživjeti.

Dokazano je da je uloga v-ATP-aze potrebna nizvodno u signalnom putu, tj. v-ATP-aza ne sudjeluje u transportu aminokiselina prema lizosomu. Nizvodni položaj označava da v-ATP-aza ima ulogu u aktivaciji mTORC1, odnosno translokaciji koja je posredovana Rag GTP-azom i Ragulatorom.

Utvrđeno je da inhibitori koji blokiraju ATP-aznu aktivnost V1 domene i rotaciju V0 domene smanjuju vezanje RagB i Raptora inducirano aminokiselinama. Točna uloga v-ATP-aze još nije poznata, ali postoji tzv. *inside out* model lizosomalne komunikacije v-ATP-aze.

On predlaže da se aminokiseline trebaju akumulirati u lizosomalnom prostoru kako bi pokrenule signalizaciju koja će se dalje prenositi kroz posrednike u citoplazmi. No, bez obzira na postojanje dotičnog modela, na brojna pitanja o načinu na koji povišene koncentracije aminokiselina utječu na signalni put aktivacija kompleksa TOR još se ne znaju odgovori.



Slika 5. Prikaz strukture i povezanosti v-ATP-aze i mTORC1, te lokalizacija na lizosomu. Preuzeto iz [4].

3.2. MAP4K3 i S6K kao aktivatori mTORC1 kompleksa [2, 9]

MAP4K3 kinaza član je Ste20 obitelji kinaza, a definirana je kao aktivator mTORC1 u odgovoru na status aminokiselina u stanici. Naime, potaknuta određenim induktorima, MAP4K3 će biti aktivirana, aktivirat će kompleks mTORC1 koji će fosforilirati S6K. Pretpostavlja se da je aktivacija mTORC1 vođena MAP4K3 omogućena interakcijom RagC/D i MAP4K3, no još se ne znaju detalji.

Dakle, MAP4K3 kinaza važna je u aktivaciji mTORC1 kompleksa. Proučavajući interakcije, znanstvenici su koristili interferirajuću RNA kako bi suprimirali MAP4K3 i uočili da se značajno smanjuje fosforilacija S6K. Prekomjerna ekspresija je, pak, poboljšala S6K fosforilaciju, ali i fosforilaciju eukariotskog proteina koji veže faktor inicijacije translacije 1

(4E-BP1). Također, prekomjerna ekspresija MAP4K3 dovela je do povećanja veličine stanice, ali je njena aktivnost neovisna o stimulaciji faktorima rasta (GF – engl. *growth factors*).

S6K odnosno *p70 S6 kinaza 1* član je ribosomalnih s6 kinaza (RSK) obitelji serin treoninskih kinaza. S6K fosforilira ogranke ribosomalnog proteina S6, sastavnog dijela 40S ribosomalne podjedinice. Time se olakšava regrutiranje 40S ribosomalne podjedinice u aktivne polisome, što vodi poboljšanoj translaciji. O S6K bit će više rečeno u sljedećim odlomcima.

3.3. PI3K/Akt/mTORC1 signalni put [2, 9]

4E-BP1 važan je u kontroli translacije jer djeluje kao inhibitor. U nefosforiliranom stanju veže se za EIF-4E, inicijacijski protein, i onemogućava mu vezanje za ostale inicijacijske faktore koji onda zajedno čine kompleks koji veže kapu (engl. *cap binding complex)*, odnosno kompleks koji se veže za guaninsku kapu na 5' dijelu mRNA čime se olakšava vezanje 40S ribosomske podjedinice. Stimulirana faktorima rasta ili inzulinom, PI3K (fosfatidilinozitol 3 kinaza) se aktivira i fosforilira Akt kinazu (protein kinaza B – PKB) koja aktivira mTORC1. mTORC1 će uzrokovati fosforiliranje 4E-BP1, a on u fosforiliranom stanju napušta EIF-4E, čime se omogućava inicijacija translacije (Slika 6.).

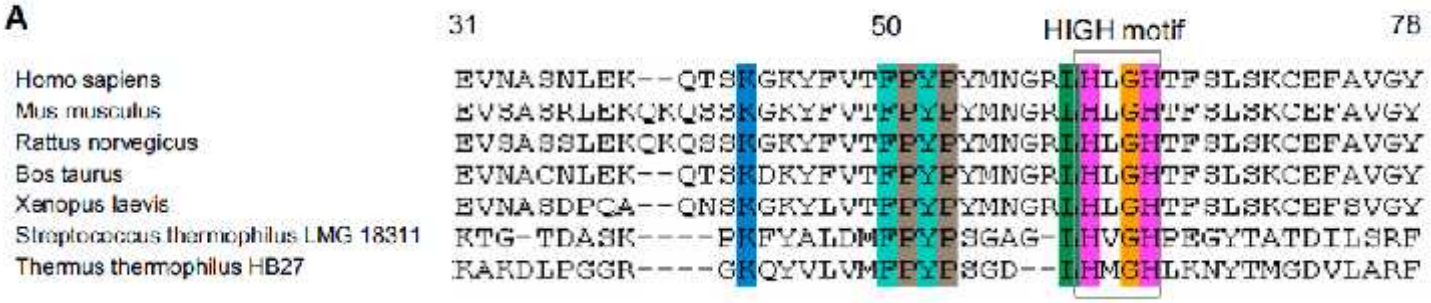
4. Interakcije mTORC1 i leucil-tRNA-sintetaze [3, 7, 10, 11]

4.1. Leucil-tRNA-sintetaza

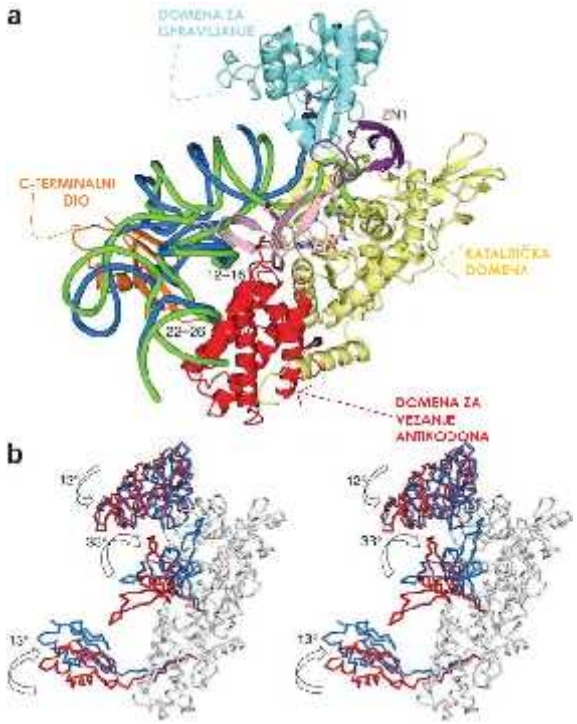
Leucil-tRNA-sintetaza član je aminoacil-tRNA-sintetaza grupe 1 koje kataliziraju vezanje određene aminokiseline na odgovarajuću tRNA u dva koraka. Prvo omogućavaju ATP-PP_i izmjenu za aktivaciju aminokiseline (nastaje adenilirana aminokiselina), a zatim aminoacilaciju tRNA. Specifičnost klase 1 u odnosu na klasu 2 je ta da enzimi te klase aciliraju 2' hidroksilnu skupinu terminalnog adenina na tRNA, pri vezanju ATP-a, ATP poprima drugačiju konformaciju te su u pravilu monomerni enzimi. Sve sintetaze općenito sadrže dvije važne domene: katalitičku i hidrolitičku. U katalitičkoj domeni omogućava se adenilacija i vezanje adenilirane aminokiseline koja pripada određenoj tRNA. Ta domena izgleda poput džepa u koji sjeda samo određena aminokiselina i dijela u koji ulazi akceptorska petlja odgovarajuće tRNA. Mogućnost sparivanja krive tRNA i aminokiseline smanjena je upravo konformacijskom restrikcijom – džep u koji sjeda aminokiselina je posebno građen, sastavljen od pažljivo probranih aminokiselinskih bočnih ogranaka koji stupaju u interakciju

samo s točnom aminokiselinom. Također, veličina i oblik džepa imaju važnu ulogu jer su i ti parametri specifični za određenu aminokiselinu. No, ako su neke aminokiseline slične ili ako dođe do pogreške u sustavu, u aktivacijskom mjestu može se dogoditi vezanje krive aminokiseline na tRNA. Zato postoji hidrolitička domena koja će pocijepati tu vezu i tRNA i aminokiselina slobodne će napustiti enzim. Zahvaljujući strukturi enzima, tRNA se bez otpuštanja prebacuje iz jedne domene u drugu čime se osigurava visoka vjerodostojnost.

Leucil-tRNA-sintetaza ima očuvan HIGH motiv, koji služi kao vezno mjesto za ATP. Hidrofobni džep koji odgovara leucinskom bočnom ogranku tvore konzervirani bočni ogranci fenilalanina (Phe50) i tirozina (Tyr52). Ako se bilo koja od ovih dviju aminokiselina zamijeni alaninom, suprimira se leucilacijska aktivnost LRS, što se očitava zbog porasta Michaelis-Menten konstante (K_M) za leucin.



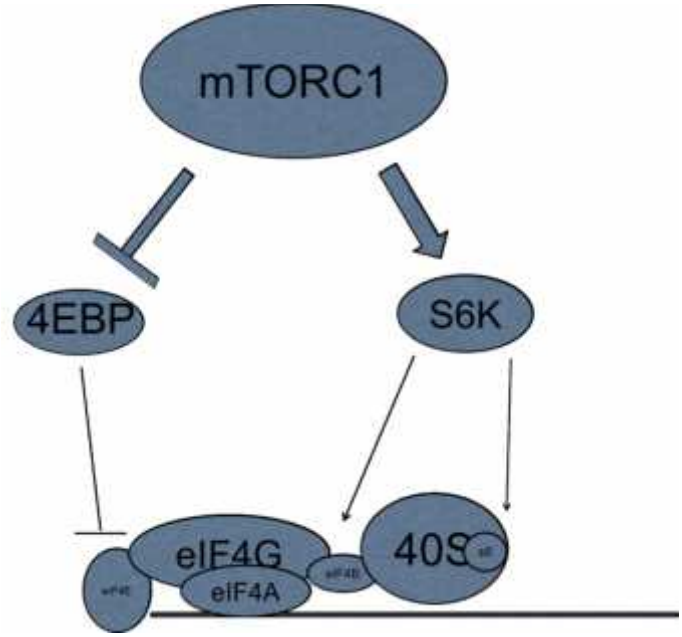
Slika 6. Poravnati aminokiselinski slijedovi LRS iz različitih organizama upućuju na visoko očuvane HIGH motive. Preuzeto iz [3].



Slika 7. Kristalna strukture leucil-tRNA-sintetaze. Preuzeto iz [12].

4.2. Istraživanje interakcija leucil-tRNA-sintetaze mTORC1 – S6K [9]

Proučavajući interakciju LRS i mTORC1, istraživači su koristili šest različitih malih interferirajućih (si) RNA za leucil-tRNA-sintetazu kako bi pratili učinak LRS inaktivacije aktivnosti (engl. *knock down)* na mTORC1 aktivaciju. Princip ovakvog *knock down*-a je jednostavan. Mala interferirajuća RNA veže se za komplementarnu mRNA u stanici i omogućuje njezinu degradaciju pomoću ribonukleaze Argonaut. Naime, učinak je mogao biti mjerljiv zbog procesa u kojem LRS i mTORC1 sudjeluju, tj. zbog krajnjeg učinka – aktivacija i poboljšanje proteinske sinteze i proliferacije stanice.



Slika 8. Shematski prikaz interakcije mTORC1 i S6K s 40S podjedinicom ribosoma. Preuzeto iz [9].

Sve su siRNA suprimirale ekspresiju LRS i inhibirale aminokiselinama induciranu S6K fosforilaciju. Uočeno je da supresija ekspresije LRS nije utjecala na druge fosforilacije, npr. Akt fosforilaciju, pa je zaključeno da je inaktivacija aktivnosti (engl. *knock out*) LRS specifična za protein S6K.

Sljedeća razina istraživanja bila je u kontekstu manjka aminokiselina u okolišu, posebice razgranatih – leucina i izoleucina. Pitanje je bilo je li leucil-tRNA-sintetaza također važna i za aktivaciju mTORC pomoću Ile. Uočeno je da manjak izoleucina ne inhibira u potpunosti metabolički put kojeg predvodi S6K, no dodatak izoleucina poboljašao je S6K fosforilaciju. Ono što je zanimljivo jest da je *knock down* LRS inhibirao aktivaciju S6K pomoću izoleucina, ali *knock down* izoleucil-tRNA-sintetaze nije imao utjecaj, što predlaže da je LRS jedina uključena u putu aktivacije mTORC1 kompleksa.



Slika 9. Shematski prikaz signalnog puta induciranog leucinom i utjecaj na translaciju.

4.3. Lizosomalna lokalizacija i utjecaj na veličinu stanice [3]

Već je u odlomku 3.1. spomenuta važnost lokalizacije mTORC1 kompleksa na lizosomu. Praćena je važnost LRS u tom procesu, točnije, inaktivacija aktivnosti (engl. *knock down*) leucil-tRNA-sintetaze. Stanice su transfecirane siRNA koja se veže za mRNA koja će biti translatirana u LRS. U lizosomima takvih transfeciranih stanica nije uočena kolokalizacija mTORC1 i Raptora. Ovi rezultati upućuju na to da je leucil-tRNA sintetaza važan medijator u lizosomalnoj lokalizaciji mTORC1 kompleksa.

Također, primjećeno je da inhibicija mTORC1 vodi k smanjenju veličine stanice, obzirom da je translacija reducirana.

4.4. LRS u direktnoj interakciji s RagD GTP-azom [3]

Istraživanje je bilo usmjereno prema interakciji LRS i ključnih komponenti mTORC1. Uočeno je da LRS koimunoprecipitira s RagD, ali ne i s ostalim Rag monomerima, pogotovo ne s RagC što se moglo očekivati obzirom da su primarne strukture RagC i RagD prilično slične. Također, dokazano je da RagD ne stupa u interakcije s ostalim tRNA sintetazama, posebno ne s IRS niti s metionil-tRNA sintetazom. Dakle, veza između LRS i RagD podjedinice mTORC1 kompleksa dokazano je specifična.

Sljedeći korak bio je istražiti koji od heterodimera pokazuje najveći afinitet za LRS. U skladu s očekivanjima, LRS je stupala u interkaciju samo RagD heterodimerima, a u koimunoprecipitaciji uočeno je da je interakcija LRS i RagB/D značajno povećana s dodatkom leucina, što indicira da je LRS i RagB/D interakcija ovisna o leucinu.

4.4.1. Peptidni slijedovi RagD GTP-aze i LRS koji stupaju u međusobnu interakciju [3]

Kako bi se utvrdilo koji točno dijelovi LRS i RagD zajedno djeluju, fuzionirao se gen za RagD s genom za GST (glutation-S-transferaza), te je translacijom dobiven fuzionirani protein koji omogućava supročišćavanje proteinskog interaktora (u ovom slučaju, LRS) i RagD iz smjese (engl. *pull down*). Ovaj fuzionirani protein vezat će se za mikrokuglice koje na površini imaju glutation, za koji GST ima visok afinitet. LRS je bila vezana s myc privjeskom koji ima sličnu funkciju kao GST. Dakle, Myc-LRS je precipitirana s GST-RagD

fragmentima da se odredi koja peptidna regija RagD stupa u interakciju s LRS. Uočeno je da su aminokiseline u intervalu od prve do 400. i od 230. do 400. stupale u interakciju s LRS. Točkastim mutacijama znanstvenici su doznali da je C terminalna regija RagD proteina vezna regija, jer kad se ta regija mutirala, nije došlo do vezanja LRS i RagD. Prekomjerna ekspresija RagD i RagB povećala je aktivaciju mTORC1 induciranu leucinom što dokazuje da je LRS vezanje za RagD kritičan korak u leucin-induciranoj aktivaciji mTORC1 kompleksa.

Također, utvrđena je i peptidna regija kojom LRS stupa u interakciju s RagD – aminokiseline koje su u intervalu od 951. do 1176., odnosno C terminalna regija. To je dokazano na sličan način kao što je napravljeno s RagD – točkastim mutacijama i mehanizmom eliminacije. Mutirane leucil-tRNA-sintetaze uspoređivane su s divljim tipom (wt) LRS u kontekstu leucin-inducirane S6K fosforilacije i eksperimentalno je dokazano da N969A ni K970A mutanti nisu omogućavali fosforilaciju S6K, dok wt LRS jest. Time je još jednom potvrđena važnost LRS i RagD interakcije za aktivaciju mTORC1 koja prethodi fosforilciji S6K.

4.1.2. Utjecaji inaktivacije aktivnosti LRS i Rag, LRS i lizosomalna lokalizacija [3]

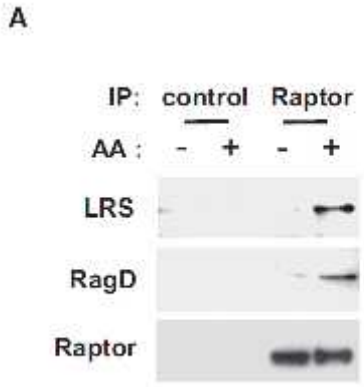
Obzirom da je LRS stupala u interakciju s RagD, ali ne i s RagC, istraživan je utjecaj inaktivacije aktivnosti (engl. *knock down*) RagD i RagC na aktivaciju mTORC1. Očekivano, RagD *knock down* imao je teži učinak na S6K fosforilaciju, a RagC *knock down* destabilizirao je heterodimere, što govori o zajedničkoj ovisnosti na stabilnost Rag proteina. LRS *knock down* suprimirao je aktivaciju mTORC1 kompleksa pomoću RagB-GTP/RagD-GDP, ali nije suprimirao aktivaciju pomoću RagB-GTP/RagC-GDP.

Sljedeće se testiralo utječe li LRS na lizosomalnu lokalizaciju mTORC1. Dokazano je da je inaktivacijom aktivnosti leucil-tRNA-sintetaze suprimirana RagB-GTP inducirana lizosomalna lokalizacija mTORC1, što govori da je LRS kritična za lizosomalnu lokalizaciju mTORC1 pomoću RagB/RagD heterodimera.

4.1.3. Molekularni kompleks LRS, RagD i Raptora ovisan o aminokiselinama [3]

Raptor, jedna od podjedinica mTORC1 kompleksa, koimunoprecipitrao je s LRS i RagD, a interakcija Raptora s RagD i LRS pojačana je dodatkom aminokiselina. U odsutnosti egzogene LRS, RagD je slabo reagirao s Raptorom, dok je prekomjerna ekspresija LRS uzrokovala bolju stimulaciju vezanja RagD i Raptora, sve uz dodatak aminokiselina (Leu). Također, smanjenjem endogene LRS, interakcije RagD-Raptor, uz dodatak aminokiselina,

bile su smanjene, što predlaže činjenicu da LRS poboljšava vezanje RagD GTP-aze i podjedinice mTORC1 – Raptora.



Slika 10. Rezultati koimunoprecipitacije LRS, RagD i Raptora. Preuzeto iz [3].

4.5. LRS kao senzor leucina u stanici [3]

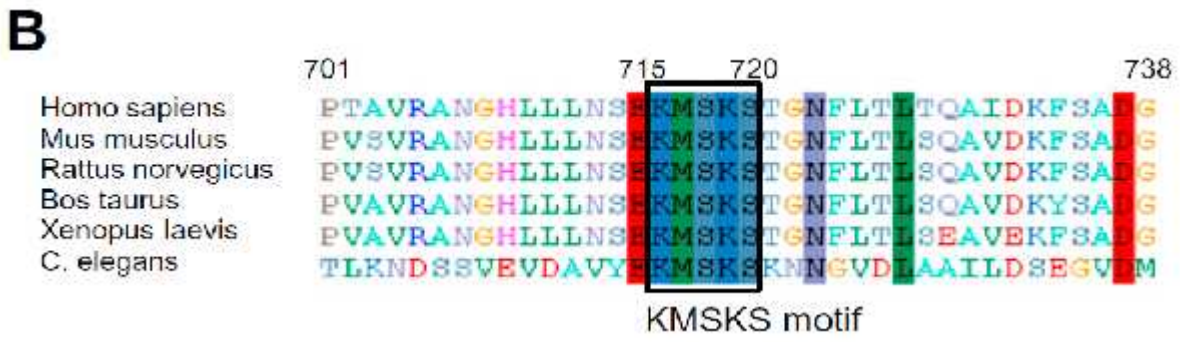
Kako bi se testirala važnost vezanja leucina na LRS za aktivaciju mTORC1 kompleksa i formaciju kompleksa LRS, RagD i Raptora, napravljena je F50A/Y52A mutirana LRS koja je imala značajno smanjenu leucilacijsku aktivnost. Uočeno je da takva LRS uz dodatak leucina ne omogućava S6K fosforilaciju, da se takav mutant ne veže za RagD niti tvori kompleks s Raptorom, što govori u prilog tome da je osjećanje i vezanje leucina pomoću LRS kritično za mTORC1 aktivaciju.

4.5.1. Neovisnost leucilacije o interakciji LRS i RagD [3]

In vitro kompeticijske analize sa LRS supstratima – leucin, ATP i $tRNA^{Leu}$, korištene su kako bi se proučilo utječe li vezanje leucina na tRNA na interakciju LRS i RagD, odnosno na mTORC1 aktivaciju. Kako bi se to dokazalo, mutirana je LRS na mjestima aminokiselina 716 i 719 (K/716A i K/719A), unutar KMSKS[3] motiva koji je važan za vezanje aminokiseline na tRNA. Ovaj mutant je pokazivao malu razinu leucilacije, a zadržao je potpunu aktivnost izmjene ATP-PP_i.

Što se tiče interakcije tog mutanta s RagB/RagD, također je identična divljem tipu, isto kao i sposobnost aktivacije mTORC1 kompleksa. Ovo dokazuje da je aktivacija mTORC1 neovisna o vezanju tRNA na LRS, odnosno neovisna o leucilaciji.

[3] Aminokiselinski slijed – lizin (K), metionin (M), serin (S), lizin, metionin.



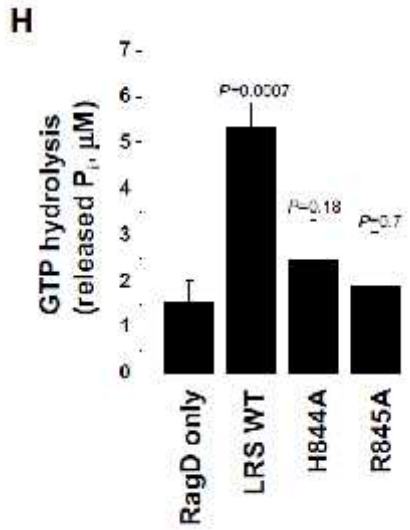
Slika 11. KMSKS motiv zajedničko je svojstvo brojnih eukariota. Preuzeto iz [3].

4.5.2. Leucil-tRNA-sintetaza je protein koji aktivira GTP-aznu aktivnost (GAP) [3, 13]

Obzirom da znamo da LRS stupa u interakciju s RagD•GTP, a ne i s RagD•GDP, otvorila se mogućnost da je LRS zapravo GAP, protein koja omogućava hidrolizu GTP-a na RagD proteinu, odnosno unutarnju GTP-aznu aktivnost. Kako bi se to provjerilo, u *in vitro* analizi korišten je fragment LRS koji stupa u interakciju s RagD – C terminalni dio. Uz dodatak leucina, LRS-C divljeg tipa poboljšala je hidrolizu GTP-a na RagD proteinu, što indicira da C terminalni dio LRS ima GAP aktivnost. HEK293T[4] stanice transfecirane su s wt LRS i s LRS koja je imala mutacije u 50. i 52. aminokiselini (F50A/Y52A). Divlji tip poboljšao je GTP-GDP izmjenu, dok je mutant izgubio GTP-aznu aktivnost. Također, inaktivacija aktivnosti LRS suprimirala je leucin-induciranu GTP izmjenu na RagD.

Prilikom poravnavanja aminokiselinskih slijedova, uočeno je da LRS sadrži i GAP motiv, motiv koji je nađen u mnogim ADP faktorima ribozilacije. Kako bi se dokazalo da je GAP motiv važan za GAP aktivnost LRS, napravljena su dva alaninska mutanta unutar tog motiva (H844A/R845A). Mutanti su izgubili svoju GAP aktivnost uspoređujući s divljim tipom LRS koji ju je zadržao. Također, ti su mutanti podvrgnuti istraživanju utjecaja na mTORC1 aktivaciju, induciranu leucinom. Divlji tip LRS pokazao je normalan (očekivan) utjecaj na S6K fosforilaciju, aktivirao ju je, dok su alaninski mutanti izgubili tu funkciju.

[4] HEK – human kidney cells – stanice koje su znanstvenici koristili kao testne u ovim istraživanjima.



Slika 12. Utjecaj wt LRS i mutantnih LRS na hidrolizu GTP-a na RagD proteinu. Analize su vršene GTP-aznim analiznim *kitom*. Preuzeto iz [3].

5. Inhibitori mTORC1 kompleksa

Obzirom na spomenute funkcije i važnosti mTORC1 kompleksa, inhibicije mogu imati teške posljedice za stanicu jer mogu voditi u autofagiju i priječiti prepisivanje proteina. Neki od inhibitora ne inhibiraju sve mTOR funkcije, stanica je našla način da se odupre i zaštiti.

5.1. Rapamicin [9, 14]

Dugo se mislilo da je rapamicin potpuni inhibitor mTORC1 kompleksa, no istraživanja 2009. godine pokazala su drugačije. Rapamicin je, kao što je spomenuto u uvodu, identificiran zbog svojih antifugalnih svojstava, a danas se koristi kao imunosupresant i u tumorskoj terapiji. Bio je vrlo koristan jer se koristio kao neiscrpan alat za istraživanje funkcija mTORC1 i zahvaljujući rapamicinu, otkrivena je velika važnost mTORC1 kompleksa kao kritičnog regulatora autofagije i sinteze proteina.

U stanicama sisavaca djeluje alosterički i onemogućava funkciju mTORC1 kompleksa. Nagađanja da rapamicin ne inhibira mTORC1 u potpunosti krenula su nakon što je dizajniran kompetitivni inhibitor kompleksa mTORC1– Torin1. Za početak se Torin1 uveo u kulturu mišjih embrionalnih stanica (MEF) i uzrokovao potpuni prekid staničnog ciklusa i smanjio sintezu proteina za skoro 50%. Iznenađujuće je bilo da je rapamicin imao vrlo slabi efekt na iste procese. Torin1 također je usmjerio stanicu u autofagiju. Znanstvenicima je to

bilo čudno, pa su nagađali da možda mTORC2 ima neku medijatorsku ulogu u autofagiji i sintezi proteina. Kako bi se hipoteza potvrdila, u nove MEF stanice uveli su mTORC2 bez Rictora (podnaslov 2.2.). U tim su stanicama (mTORC2 bez Rictora) učinci bili isti kao u divljem tipu stanica MEF – Torin1 nastavio je supresiju translacije i aktivirao autofagiju. Ovime je potvrđeno da su neke funkcije mTORC1 blokirane zbog Torina 1, ali otporne na inhibiciju rapamicinom.

Uočeno je da rapamicin blokira fosforilaciju 4E-BP1, jednog od supstrata mTORC1. Naime, mRNA za koje se veže eIF-4E kodiraju za proteine s proliferativnom funkcijom i za tranziciju G1→S staničnog ciklusa. Blokirajući translaciju tih mRNA, blokira se stanični ciklus. To je jedan od prijedloga djelovanja rapamicina, ali on tek djelomično inhibira fosforilaciju 4E-BP1, potrebna su dodatna istraživanja.

Korisnost rapamicina očituje se u činjenici da se koristi u poremećajima prirodne supresije mTORC1 – poremećaji u TSC-u. Naime, postoji genetički poremećaj koji uzrokuje inaktivaciju uzvodnih inhibitora mTORC1, pa se u terapijama tih poremećaja koristi rapamicin kao terapeutski inhibitor.

5.2. Ursolična kiselina [15]

Ursolična kiselina (UA) je pentaciklički triterpenoid kojeg nalazimo u brojnim biljkama i voću, a koristi se u liječenju hiperglikemije, pretilosti i tumora. No, molekularni mehanizmi djelovanja još su uvijek nepoznanica. Srećom, postoje neka novija saznanja (2014.) o njezinom djelovanju na mTORC1.

Kako bi se utvrdio učinak UA na mTORC1, korišteni su C2C12 miotubuli (već je spomenuto da mTORC1 regulira anaboliza u mišićnim stanicama) tretirani različitim koncentracijama ursolične kiselne, te s dodanim inzulinom i leucinom (kontrole). Naime, inzulin je stimulirao S6K, 4E-BP1 i Akt fosforilaciju, dok je fosforilacija bila inhibirana dodatkom UA. Leucin je stimulirao S6K i 4E-BP1 fosforilacije, ali nije stimulirao Akt fosforilaciju obzirom da ne djeluje stimulatorno na taj metabolički put. UA je također inhibirala i ove fosforilacije.

Zatim je tražen način na koji UA djeluje. Principom eliminacije neki su se dijelovi signalnog puta eliminirali, no, utvrdilo se da UA ima djelovanje usmjereno na Rag GTP-aze. Konfokalnom imunofluorescencijom dokazano je da C2C12 stanice s povećanom

koncentracijom leucina pokazuju kolokalizaciju mTORC1 s lizosomalnim markerom LAMP1. Dodatkom ursolične kiseline, ta se kolokalizacija izgubila što nam govori da ursolična kiselina inhibira lizosomalnu lokalizaciju mTORC1 koja je ključna u aktivaciji ovog kompleksa.

UA se može koristiti u terapiji tumora jer i oni imaju aktivan proliferativni mTORC1 signalni put, pa se dodatkom UA taj put može blokirati.

6. Autofagija [1, 16]

Autofagija je katabolički proces u kojem se stanični organeli odvajaju u autofagosome i degradiraju u lizosomima. Pri niskoj količini nutrijenata, stanica treba na neki način doći do sastavnih dijelova, pa je autofagija jedan od načina. Razgradnjom organela i proteinskih kompleksa omogućava se dostupnost biološkog materijala koji se može koristiti za anaboličke procese poput sinteze proteina i proizvodnje energije.

Obzirom da mTORC1 regulira ključne komponente regulatornih puteva vezanih uz rast i proliferaciju, mTORC1 povezan je s autofagijom. Kada je stanje obilja energije, mTORC1 je stimuliran, a autofagija inhibirana. Regulacija se odvija na način da mTORC1 fosforilira i inaktivira Atg (engl. *autophagy-related protein*) proteine uključene u nastajanje autofagosoma. Pri inhibiciji mTORC1, Atg proteini su defosforilirani i aktivni, mogu potaknuti gradnju autofagosoma.

Za sada mTORC1 još uvijek nije karakteriziran kao regulator transkripcije gena za autofagiju, pa su istraživanja pokazala važnost transkripcijskog faktora EB u tom pogledu. mTORC1 regulira nuklearnu lokalizaciju i aktivnost TFEB koji je član bHLH *leucin-zipper* obitelji proteina koji reguliraju ekspresije gena za autofagiju i za lizosomalne strukture.

U uvjetima normalne količine nutrijenata, TFEB je fosforiliran na serinu 11, što regulira mTORC1. Fosforiliran TFEB veže se za YWHA protein u citoplazmi što priječi ostale transkripcije faktore da uđu u jezgru. Čim padne količina nutrijenata, mTORC1 je inaktivan, TFEB se ne fosforilira, ne veže se za YWHA protein, ulazi u jezgru i kreće transkripcija autofagnih gena.

7. Sažetak

Kompleks mTORC1 pokazao se važnim dijelom signalnih puteva u stanici. Nakon njegovog otkrića, otvorena su brojna pitanja o funkciji ovog kompleksa. Dokazano je da ima brojne zadaće u organizmu vezane uz regulaciju sinteze proteina, biogenezu ribosoma, unos nutrijenata i autofagiju, anablizam aminokiselina te energetski status stanice.

Blagi naglasak je stavljen na interakciju kompleksa mTORC1 i leucil-tRNA-sintetaze za koju se pretpostavlja da omogućuje osjećanje aminokiselinskog statusa u citoplazmi stanice, odnosno okolišnu dostupnost nutrijenata. Uz općepoznatu funkciju LRS koja obuhvaća vezanje leucina na odgovarajuću tRNA, otkriveno je da LRS ima važnu funkciju u regulaciji unutarstaničnih procesa koju joj omogućuje interakcija s kompleksom mTORC1. Ključnu ulogu ovdje ima leucin, čije je vezanje za LRS ključno za aktivaciju mTORC1. LRS veže leucin u svoje aktivno mjesto i tada djeluje kao GAP za RagD GTP-azu. Aktivni oblik Rag heterodimera osigurava interakciju heterodimera s kompleksom mTORC1 čime se usmjerava relokalizacija mTORC1 na lizosomalnu membranu.

Još jedan način aktivacije mTORC1 kompleksa je putem vakuolarne ATP-aze – ali ne u citoplazmi već na površini lizosoma. Predlaže se *inside-out* mehanizam prema kojem se aminokiseline akumuliraju unutar lizosoma, a v-ATP-aza ih osjeća na još nepoznat način. v-ATP-aza kontrolira vezanje Rag GTP-aze i Ragulatora, a time i GEF aktivnost Ragulatora. GEF aktivnost Ragulatora očituje se prema proteinima RagA i RagB jer je njihovo GTP vezno stanje važno za aktivaciju kompleksa mTORC1. Aktivirani Rag kompleks veže se za mTORC1 i regrutira ga na lizosomalnu membranu. Pretpostavlja se da se mTORC1 smješta blizu Rheb, jer Rheb-GTP stimulira mTORC1.

mTORC1 u interakciji je i s kinazom MAP4K3, koja pod utjecajem određenih induktora aktivira mTORC1 koji će onda aktivirati S6K kinazu,a ona olakšava regrutaciju 40S podjedinice u aktivne polisome čime se poboljšava translacija. Također, postoji i PI3K/Akt signalni put u kojem mTORC1 uzrokuje fosforiliranje 4E-BP1, a on u fosforiliranom stanju napušta EIF-4E, čime se omogućava inicijacija translacije. Oba signalna puta imaju isti cilj – potaknuti translaciju i omogućiti nastajanje proteina koji vode u stanični rast.

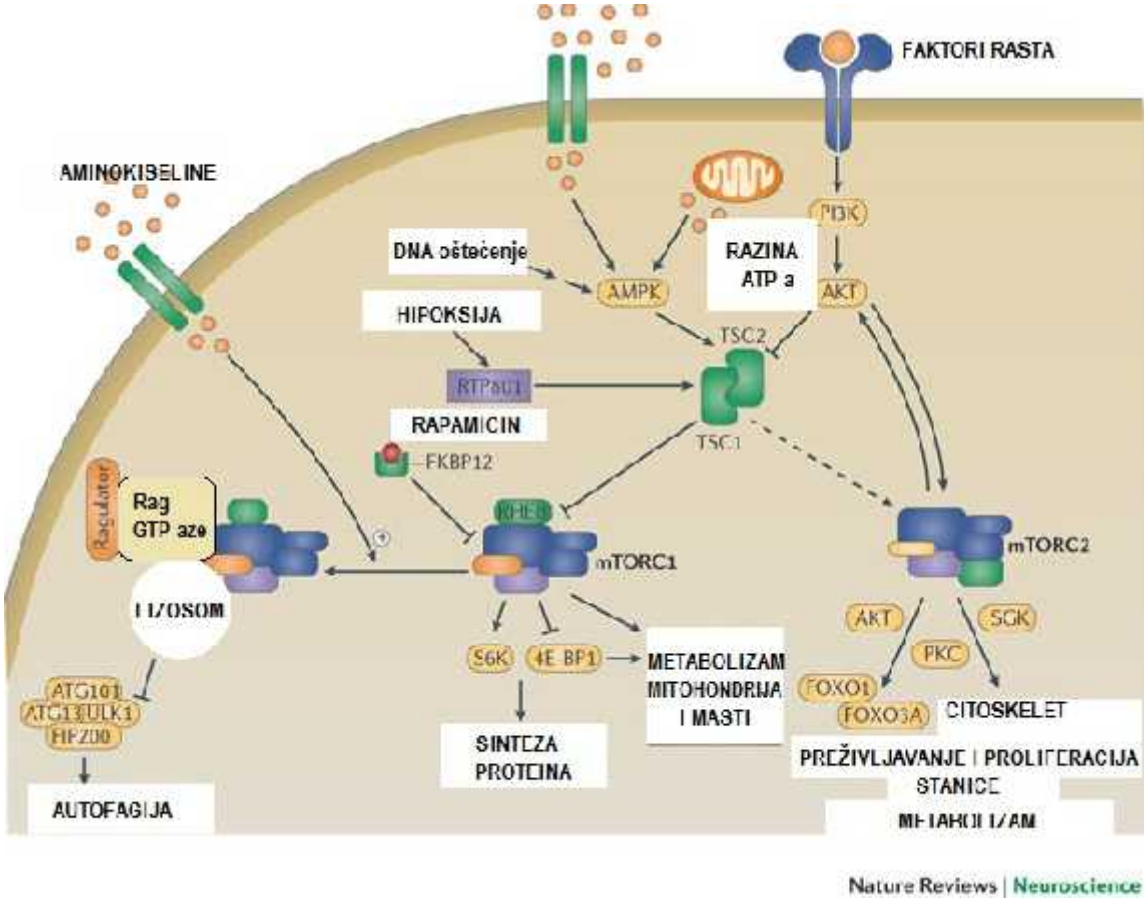
Uz aktivatore, prisutni su i inhibitori. Po jednom od inhibitora mTORC1 nosi i ime - mehanička meta rapamicina. Zahvaljujući rapamicinu otkriven je mTOR i njegov signalni put. Novija istraživanja ukazuju na to da rapamicin ne inhibira u potpunosti mTORC1, ali se još

uvijek ne znaju svi dijelovi metaboličkog puta koje rapamicin inhibira, odnosno ne inhibira. Ursolična kiselina je jedan od inhibitora čija je meta otkrivena – priječi lizosomalnu lokalizaciju mTORC1 kompleksa jer djeluje na Rag GTP-aze. Inhibitori mTORC1 koriste se i u terapijama stanica koje nekontrolirano rastu – tumorima, pa u tom pogledu imaju i korisne značajke.

Autofagija je još jedan od procesa koji je koordiniran mTORC1 signalnim putevima obzirom da promovira kataboličke procese, što je suprotno od mTORC1 zadaće – anabolija proteina.

Brojne karakteristike mTORC1 interakcija još su nepoznanica. Na primjer, još se ne zna koji točno kompleks i na koji način osjeća razinu aminokiselina, ali mnogo se znanstvenika u svijetu bavi ovom temom i činjenica je da je mTORC1, bez obzira da brojne nepoznanice, još uvijek bolje istražen od mTORC2 kompleksa.

U ovom seminarskom radu nisu obuhvaćene sve funkcije i interakcije mTORC1 kompleksa jer ih ima mnogo. Procesi koje mTORC1 posredno ili neposredno regulira prilično su kompleksni i ne čudi da stupa u interakciju s više proteina nego što je u ovom radu navedeno.



Slika 12. Prikaz kompleksnosti mTORC1 signalnih puteva. Preuzeto iz [16].

8. Summary

mTORC1 complex is a very important part of signal pathways in the cell. Its discovery posed a variety of questions about its function. It is shown that mTORC1 complex has many duties in protein synthesis regulation, rybosome biogenesis, nutrient intake and autophagy, amino acids anabolism and cell energy status.

A mild emphasis was put on mTORC1-LRS interaction for which is thought that enables amino acid presence sensing, especially leucine, in the cell cytoplasm. Except well known LRS leucilation function, it is discovered that LRS also has a major role in intracelular processes guided by mTORC1. Leucine has a key role in this signal pathway. When LRS binds Leu, LRS acts as a GAP for RagD-GTPase. Active form of Rag heterodimer ensures its interaction with mTORC1, which enables mTORC1 relocalization to the lysosome membrane.

Another way of mTORC1 activation is by vacuolar ATPase. It is not established in the cytoplasm, but on the lysosome membrane. It is considered that this activation follows an „inside-out“ model by which amino acids are acumulated inside of lysosome, and v-ATPase is sensing them by a still unknown mechanism. v-ATPase controls interaction of Ragulator and Rag GTPase, and by that also the GEF function of Ragulator. Ragulator shows GEF activity for RagA and RagB proteins, since their GTP bound status is important for mTORC1 activation. Activated Rag complex binds to mTORC1 and recruits it to the lysosome membrane. It is assumed that mTORC1 is located near Rheb, because Rheb-GTP also stimulates mTORC1 activity.

mTORC1 interacts with MAP4K3 kinase, which is activated by certain inductors and then can activate mTORC1 complex. Activated mTORC1 then activates S6K kinase which facilitates 40S subunit recruitment into active polysomes. There is also a PI3K/Akt pathway in which mTORC1 ensures phosphorilation of 4E-BP1, which then leaves EIF-4E, and by that, initiation of translation can occur. Both of the signal pathways have the same goal – to induce translation and enable protein synthesis which leads to cell growth.

Besides activators there are also inhibitors of mTORC1. mTORC1 is named after one of its inhibitors - mammalian target of rapamycin. Thanks to rapamycin, mTORC1 was disovered. Recent studies indicate that rapamycin does not inhibit all of mTORC1 functions, but it is still unknown which of the pathways rapamycin inhibits. Ursolic acid is one of the inhibitors whose target is known – it inhibits lysosomal translocation of mTORC1 because UA interacts with Rag GTPases. Inhibitors of mTORC1 are used in tumor therapy, so they also have useful applications.

Autofagy is another process which is coordinated by mTORC1 signal pathways, considering the fact that it promotes catabolic processes, which is opposite of mTORC1 duties – protein anaboly.

Lot of characteristics of mTORC1 that are still unrevealed. For example, it is still not known which protein exactly senses amino acids, but there are lot of scientists interested in this theme and are actively researching. But, regardless of many unknowns, mTORC1 functions are more thoroughly researched than mTORC2.

In this seminar not all of the mTORC1 functions and interactions were mentioned because there are too many. Processes that mTORC1 regulates, directly or indirectly, are very

complex, therefore it is no surprise that it interacts with more proteins than it was described in this seminar.

9. Literatura

1. Jenna L. Jewell, Ryan C. Russel, Kun-Ling Guan; Amino acid signalling upstream of mTOR, *Published online 30 January 2013, doi:10.1038/nrm3522* **2013**., 1-7
2. Mathieu Laplante, David M. Sabatini; mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* **2009**., *20*, 3589-3594
3. Jung Min Han, Seung Jae Jeong, Min Cung Park, Nam Hoon Kwon, Hoi Kyoung Kim, Sanh Hoon HA, Sung Ho Ryu, Sunghoon Kim; Leucy-tRNA-synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1 signaling pathway, *Cell* **2012**., *149*, 410-424
4. Jenna L Jewell, Ryan C. Russel, Kun-Liang Guan; Amino acid signaling upstream of mTOR, Nature Reviews Molecular Cell Biology **2013.,** *14,* 133-139
5. Jose J. Limon, David A. Fruman; Akt and mTOR in B cell activation and differentiation; Published online 6 August 2012, doi: 10.3389/fimmu.2012.00228
6. Raul V Duran, Michael N Hall; Regulation of TOR by small GTPases; Published online 13 January **2012**, doi: 10.1038/embor.2011.257
7. Kayleigh M. Dodd and Andrew R. Tee; Leucine and mTORC1: a complex relationship, *American Journal pf Physiology – Endocrinology and Metabolism* **2012**., *302*, 1329-1342
8. Roberto Zoncu, Liron Bar-Peled, Alejo Efeyan, Shuyu Wang, Yasemin Sancak, David M. Sabatini; mTORC1 senses lysosomal amino acid through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H^+-ATPase, *Science* **2011**., *334*, 678-683
9. www.en.wikipedia.org
10. David L. Nelson, Michael M. Cox; *Lehniger, Principles of biochemistry*; W. H. Freeman and Company: New York 2008.
11. Jeremy M. Berg, John L.Tymoczko, Lubert Stryer; *Biochemistry*; W. H. Freeman and Company: New York 2012.
12. Andres Palencia, Thibaut Crepin, Michael T Vu, Tommie L Lincecum Jr, Susan A Martinis, Stephen Cusack; Structural dynamics of the aminoacylation and proofreading functional cycle pf bacterial leucyl-tRNA sythetase, Nature Sructural & Molecular Biology **2012.**, *19*, 677-684

13. Raul V. Duran, Michael N. Hail; Leucy-tRNA-synthetase: a double duty in a amino acid sensing, *Published online : 24 April 2012, doi: 10.1038/cr.2012.68* **2012**., *22*, 1207-1209
14. Carson C. thoreen, David M. Sabatini; Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely, *Autophagy 5:5* **2009**., 725-726
15. Xiang Ou, Meilian Liu, Hairon Luo, Lily Q. Dong, Feng Liu; Ursolic acid inhibits leucine stimulated mTORC1 signaling by supressing mTOR localization to lysosome, PloS ONE e95393. doi: 10.1371/journal.pone.095393 **2014**., *9 (4)*
16. Jose A. Martina, Yong Chen, Marjan Gucek, Rosa Puertollano; mTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB, *Autophagy 8:6* **2012**., 903-914